

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-000300

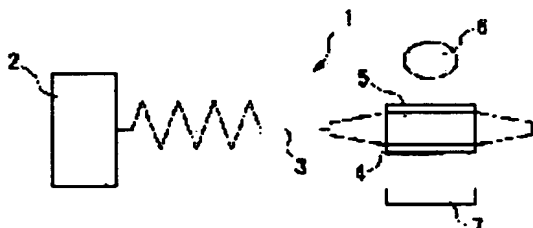
(43)Date of publication of application : 07.01.2003

(51)Int.Cl.	C12Q	1/68
	C12M	1/00
	C12M	1/38
	C12M	1/40
	C12N	15/09
	G01N	33/53
	G01N	33/566

(21)Application number : 2001-184949 (71)Applicant : MITSUBISHI HEAVY IND LTD

(22)Date of filing : 19.06.2001 (72)Inventor : TAKEUCHI KAZUHISA
SUGIMORI MIHO

(54) METHOD FOR DETERMINING BASE SEQUENCE OR METHOD FOR QUANTITATIVELY MEASURING NUCLEIC ACID BY USING DNA CHIP



(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method by which hybridization is carried out with high quantification at once by using a DNA chip, and further to provide an apparatus for carrying out the method.

SOLUTION: The method for determining a base sequence or that for quantitatively measuring a nucleic acid, use a DNA chip having plural number of base sequences as a same sequence immobilized thereon, and arranged in one row. The method by using the DNA chip is characterized in that the method comprises forming a temperature gradient in the direction of the immobilized same base sequences,

subjecting the same base sequence to be detected to the hybridization on the DNA chip after labeling the each base sequence to be detected, washing the resultant chip by a buffer solution, and determining the base sequence to be detected by comparing the intensities of the label of each base sequence immobilized in the row. The device for the method for determining the base sequence or quantitatively measuring the nucleic acid is characterized in that the device has a buffer solution-storing container, a means for heating the buffer solution, a passage for flowing the buffer solution on the DNA chip, and a means for measuring the intensity of the label.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.01.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

**JPO and NCIP are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.**

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect
the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Two or more base sequences which have the same array are the base
sequence determination or the nucleic-acid quantum approaches using the DNA chip
fixed by one train. After establishing a temperature gradient in the direction in which
the same base sequence is fixed and carrying out the indicator of the base sequence
which should be detected, hybridization is carried out on a DNA chip. Subsequently,
the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using the
DNA chip characterized by carrying out the quantum of the amount of nucleic acids of
the base sequence which should be this detected by measuring the reinforcement of
the indicator of each base sequence fixed by one train after the buffer solution
washes.

[Claim 2] The base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach
using the DNA chip according to claim 1 characterized by having fixed the direction of
the same array of a DNA chip perpendicularly, having prepared the heating unit in the
upper part of this DNA chip, having prepared both cooling both [either or] in the
lower part, and establishing a temperature gradient perpendicularly.

[Claim 3] The base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach
using the DNA chip characterized by carrying out the quantum of the amount of
nucleic acids of the base sequence which should be this detected by being the base

sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using a DNA chip, and this buffer solution's washing, carrying out hybridization at low temperature on a DNA chip, and carrying out the temperature up of the buffer solution with time subsequently after carrying out the indicator of the base sequence which should be detected, and carrying out monitoring of the reinforcement of the indicator of each base sequence in a temperature up process.

[Claim 4] The base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using the DNA chip according to claim 3 characterized by carrying out the quantum of the amount of nucleic acids of the base sequence which should detect the temperature to which the variation in the reinforcement of the indicator of each base sequence in a temperature up process becomes the largest, and should be this detected by measuring the reinforcement of the indicator in this temperature.

[Claim 5] Base sequence determination according to claim 3 or 4 or equipment for the nucleic-acid quantum approaches characterized by having a buffer-solution storage container, the heating means of this buffer solution, the passage for pouring this buffer solution for a DNA chip top, and a means to measure the reinforcement of an indicator.

[Claim 6] Base sequence determination according to claim 5 or equipment for the nucleic-acid quantum approaches characterized by the heating means of the buffer solution being what heats the circumference of a DNA chip or a DNA chip.

[Claim 7] The base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using the DNA chip which is the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using a DNA chip, and is characterized by detecting the base sequence which irradiated hybridization temperature from [of a DNA chip] the flat surface with time, and became 2 chains about a temperature up or the light source used as the laser sheet at the DNA chip by carrying out hybridization on a DNA chip, making the temperature lower with time.

[Claim 8] The base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using the DNA chip which is the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using a DNA chip, and is characterized by detecting with time only a temperature up or the base sequence which was made to carry out hybridization on a DNA chip, making the temperature lower, and became 2 chains for hybridization temperature using an electrochemical means.

[Claim 9] The base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using the DNA chip which is the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using a DNA chip, is made to carry out hybridization on a DNA chip,

making hybridization temperature lower with time from an elevated temperature, and is characterized by detecting the base sequence which added the reagent which detects only 2 chains specifically to the hybridization solution, and became 2 chains.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the equipment for enforcing the approach and this approach of performing high hybridization of quantum nature at once.

[0002]

[Description of the Prior Art] A DNA chip can arrange hundreds – hundreds of thousands of DNA probes in the shape of an array on about two 1–2cm solid-state front face, and can perform detection, screening, etc. of DNA by quick and low cost. If this is used, it can distinguish whether the target gene exists in a sample in an instant.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, the base sequence on a DNA chip is comparatively as short as 25 base extent, DNA of varieties exists in one substrate, and since they have a different base sequence, respectively and have the different optimal hybridization temperature, a problem produces them in singularity in many cases.

[0004] Therefore, this invention aims at offering the equipment for enforcing the approach and this approach of performing high hybridization of quantum nature at once using a DNA chip.

[0005]

[Means for Solving the Problem] this invention persons paid their attention to the singularity of hybridization that temperature serves as an important factor, as a result of inquiring wholeheartedly that the above-mentioned purpose should be attained. And two or more base sequences which have the same array have been arranged on a DNA chip at the single tier, and when using a means to establish a temperature gradient in the array direction, or a means to change temperature with time to the base sequence on a DNA chip, a header and this invention were completed for the ability of high hybridization of quantum nature to be performed at once.

[0006] Namely, the first invention of this invention is the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using the DNA chip by which two or more base sequences which have the same array were fixed by one train. After establishing a temperature gradient in the direction in which the same base sequence is fixed and carrying out the indicator of the base sequence which should be detected, hybridization is carried out on a DNA chip. Subsequently, after the buffer solution washes, the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using the DNA chip characterized by carrying out the quantum of the amount of nucleic acids of the base sequence which should be this detected is offered by measuring the reinforcement of the indicator of each base sequence fixed by one train.

[0007] Although it is desirable to carry out at an elevated temperature as for hybridization if singularity (selectivity) is thought as important, there is a problem that reinforcement (hybridization reinforcement) becomes low. On the other hand, although reinforcement will become high if it carries out at low temperature, there is a problem that singularity becomes low. Therefore, although it was low temperature as much as possible and it was desirable to have performed hybridization on the target base sequence and the conditions to hybridize, when the conventional DNA chip was used, it was difficult [it] to find out these conditions. As mentioned above, if means to establish a temperature gradient in the direction in which the same base sequence is fixed are taken, the reinforcement of each base sequence can be detected easily and the quantum of the amount of nucleic acids of the base sequence made into the purpose can be carried out specifically.

[0008] The second invention of this invention is the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach of having used the DNA chip. After carrying out the indicator of the base sequence which should be detected, hybridization is carried out at low temperature on a DNA chip. Subsequently, this buffer solution washes, carrying out the temperature up of the buffer solution with time. The base sequence

determination or the nucleic-acid quantum approach using the DNA chip characterized by carrying out the quantum of the amount of nucleic acids of the base sequence which should be this detected is offered by carrying out monitoring of the reinforcement of the indicator of each base sequence in a temperature up process. This approach carries out the temperature up of each base sequence fixed by the DNA chip with time. If hybridization is carried out at low temperature, the array of those other than the base sequence made into the purpose can be hybridized. Subsequently, if the buffer solution which carried out the temperature up with time washes, hybridization reinforcement falls [the thing which has a large mismatch]. Therefore, if this means is used, a temperature characteristic pattern characteristic of each base sequence can be obtained. Moreover, the temperature to which the variation in the reinforcement of an indicator becomes the largest is easily detectable by using this approach. Since it is thought that this temperature of singularity is the highest, the quantum of the amount of nucleic acids of the base sequence can be easily carried out by measuring those reinforcement.

[0009] The third invention of this invention offers the equipment for using for the above-mentioned base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach characterized by having a buffer-solution storage container, the heating means of this buffer solution, the passage for pouring this buffer solution for a DNA chip top, and a means to measure the reinforcement of an indicator. If this equipment is used, the temperature up of each base sequence fixed by the DNA chip and a temperature fall can be performed easily, and high hybridization of quantum nature can be performed at once.

[0010] The fourth invention of this invention is the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach of having used the DNA chip, and offers the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using the DNA chip characterized by detecting the base sequence which irradiated hybridization temperature from [of a DNA chip] the flat surface with time, and became 2 chains about a temperature up or the light source used as the laser sheet by carrying out hybridization on a DNA chip, making the temperature lower at the DNA chip. By hybridizing with the base sequence fixed by the DNA chip, the base sequence which should be detected serves as 2 chains, and is fixed to a DNA chip. In the case of a single strand, the inside of a hybridization solution is floated, and it is not fixed to a DNA chip. Therefore, if the light source used as the laser sheet is irradiated from [of a DNA chip] a flat surface at a DNA chip, only 2 chains can be detected and the quantum of the amount of nucleic acids of the base sequence can be carried out

easily.

[0011] The fifth invention of this invention is the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach of having used the DNA chip, and offers the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using the DNA chip characterized by detecting with time only a temperature up or the base sequence which was made to carry out hybridization on a DNA chip, and became 2 chains for hybridization temperature using an electrochemical means, making the temperature lower. By using an electrochemical means, only the base sequence used as 2 chains is detectable with high degree of accuracy.

[0012] The sixth invention of this invention is the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach of having used the DNA chip, making hybridization temperature lower with time from an elevated temperature, hybridization of it is carried out on a DNA chip, adds the reagent which detects only 2 chains specifically to a hybridization solution, and offers the base sequence determination or the nucleic-acid quantum approach using the DNA chip characterized by detecting the base sequence used as 2 chains. The reagent which detects only 2 chains specifically is used for this approach. If the reagent which detects only 2 chains specifically is used, even if it is the case where light is irradiated from [of a DNA chip] a top face unlike the case of the fourth invention, 2 chain base sequence is detectable.

[0013]

[Embodiment of the Invention] The first invention of this invention fixes two or more base sequences which have the same array first on a DNA chip at a single tier. Thus, the base sequence fixed by the single tier is fixed on two or more kind DNA chip. Subsequently, a temperature gradient is established in the direction in which the same base sequence is fixed. A temperature gradient can be suitably set up in consideration of the approximation nature of the optimal hybridization temperature of the base sequence from which it differs on a DNA chip. Moreover, as for temperature spacing of each base sequence, taking small is desirable when the optimal hybridization temperature of a different base sequence approximates.

[0014] It is desirable to perform a setup of a temperature gradient by the following approaches. First, the direction of the same array is perpendicularly fixed for a DNA chip. Since the rate which temperature diffuses is quicker than the rate which the matter diffuses when the direction of the same array is fixed horizontally, hybridization cannot fully be performed. And a heating unit is prepared in the upper part and both cooling both [either or] are prepared in the lower part. Thereby, a temperature gradient can be made to form perpendicularly.

[0015] Subsequently, after carrying out the indicator of the base sequence which should be detected, hybridization is carried out on a DNA chip. Although the approach using a fluorescence reagent as the approach of an indicator, the approach using radioisotope, etc. are mentioned, for example, the approach using a fluorescence reagent is desirable. Hybridization should just add a hybridization solution on a DNA chip. Reaction time can be suitably set up according to the die length of the array made to hybridize etc. Subsequently, it washes using the buffer solution and the background is removed.

[0016] Thus, since it has the indicator reinforcement specific [the part held at the optimal hybridization temperature among the same base sequences arranged by the single tier on the obtained DNA chip], and maximum, the quantum of the amount of nucleic acids of this base sequence can be carried out in a high precision.

[0017] After the second invention of this invention carries out the indicator of the base sequence which should be detected first, hybridization of it is carried out at low temperature on a DNA chip. The approach of an indicator is the same as that of the above. Here, "low temperature" means the temperature which is extent in which the base sequence which should be detected can carry out hybridization to all the base sequences on a DNA chip. That is, in the second invention, hybridization of the base sequence which should be detected is carried out to all the base sequences on a DNA chip. This uses hybridizing, even if it is the low base sequence of a complementarity at low temperature.

[0018] Subsequently, this buffer solution washes a DNA chip, carrying out the temperature up of the buffer solution with time. As an approach of heating the buffer solution, although there is especially no limit, the approach of heating a buffer-solution storage container directly, the approach of heating all over Rhine from a buffer-solution storage container to a DNA chip, or the method of heating a DNA chip and its circumference directly is mentioned, for example. What is necessary is just to raise the reinforcement of a heating means with time, in order to carry out a temperature up with time. The fixed thing of a programming rate is desirable. The background is removed by washing a DNA chip with the buffer solution.

[0019] Subsequently, change of the indicator reinforcement of each base sequence on a DNA chip with time is measured. Here, although hybridization is carried out also by the low base sequence of a complementarity at low temperature, it dissociates from 2 chains with many mismatches as a temperature up is carried out. And the variation in the reinforcement of the indicator of each base sequence on a DNA chip becomes the largest at a certain specific temperature. Since it is thought that singularity becomes

the largest at this temperature, the quantum of the amount of nucleic acids is carried out from the reinforcement of the indicator in that temperature.

[0020] Drawing 1 shows an example of the equipment for carrying out the second invention. This equipment 1 consists of Rhine 3 to the DNA chip top of the buffer-solution storage container 2 and the buffer solution, the passage 5 on a DNA chip, the light source 6, and a detecting element 7 in drawing 1 . The buffer solution is heated all over Rhine 3 to the buffer-solution storage container 2 and/or DNA chip 4. The temperature up of the temperature of the buffer solution is carried out with time from low temperature. After hybridization ending at low temperature, the buffer solution is sent on a DNA chip (buffer-solution passage 5), carrying out a temperature up with time. Indicator reinforcement is measured by the detecting element 7 after removal of the background by washing using the light source 6.

[0021] Drawing 2 shows other examples of the equipment for carrying out the second invention. The heating unit 8 of the buffer solution is in the upper part of a DNA chip. In case the buffer solution passes through the buffer-solution passage 5, it is heated by the heating unit 8. The heating reinforcement in a heating unit 8 is adjusted so that the temperature up of the temperature of the buffer solution may be carried out with time from low temperature. In drawing 2 , detector 7' has illustrated light source 6' and the equipment which is in a same side to a measuring object object, using an optical fiber as an indicator measuring device on the strength. However, a measuring device is not limited to this.

[0022] The fourth invention of this invention irradiates from [of a DNA chip] a flat surface, detects the base sequence used as 2 chains, and determines the light source used as the laser sheet as a DNA chip. That is, only what was hybridized on the DNA chip is detected by irradiating a DNA chip from [of a DNA chip] a flat surface. High hybridization of quantum nature can be performed quickly at once, without performing washing of the background, and removal with time by performing a temperature up or detection by the approach of starting carrying out hybridization making the temperature lower.

[0023] First, with time, hybridization is carried out on a DNA chip, making the temperature lower, and, subsequently the fifth invention of this invention detects only a temperature up or the base sequence which became 2 chains on the DNA chip using an electrochemical means. Thereby, high hybridization of quantum nature can be performed quickly at once, without performing washing of the background, and removal.

[0024] An example of the detecting method by the electrochemical means is shown

below. Recently, double-stranded-DNA discernment ability was very high, and the new ligand FND (ferrocenylnaphthalenediimide derivative) which shows the stable electrochemical response was developed. This has the structure where a ligand substituent jumps out to both the major groove of DNA duplex RASEN, and a minor groove, by sewing in and carrying out mold intercalation to the double stranded DNA. Ligand is made hard to dissociate from DNA duplex RASEN at the same time these substituent sections serve as a clamp and stabilize DNA duplex RASEN. However, since there is such no effectiveness to a single stranded DNA, very high joint singularity is shown to the double stranded DNA.

[0025] The concept of the DNA detection system using Ligand FND is shown in drawing 3 . First, the thiol-ized DNA probe is combined with a golden electrode, and a sample DNA fragment and hybridization are performed. And it measures with the solution containing ligand and the oxidation reduction response of ligand is measured by the electrochemical technique. The amount of 2 chain formation of the purpose gene is quantified by this. As the electrochemical technique, the current accompanying oxidation of ligand flows near 460mV by using differential pulse Volta MOGURAFI (DPV). The current value by concentration of the ligand on an electrode increases according to the amount of formation of 2 chains.

[0026] Hybridization of the sixth invention of this invention is carried out on a DNA chip, making hybridization temperature lower with time from an elevated temperature first. Subsequently, the reagent which detects only 2 chains specifically is added to a hybridization solution, and the base sequence used as 2 chains is detected. As a reagent which detects only 2 chains specifically, it is SYBR, for example. Green I (trademark: Molecular Probes, Inc) is mentioned. Although detection can be performed by irradiating 254nm UV, it is not limited to this approach.

[0027] Next, although an example is shown and this invention is further explained to a detail, this invention is not limited to the following examples.

[0028] Seven kinds of base sequences expressed with the example 1 array numbers 1-7 are arranged in one train on a plurality [every] DNA chip, respectively, and a DNA chip is fixed so that the direction of a train may become in the direction of a vertical. Seawater 1L is filtered with 0.2-micrometer NUKURE pore filter, and RNA is extracted from the bacteria on a filter. A magnesium chloride decomposes this RNA, and the ribose of after dephosphorylate and a nucleic acid is oxidized by alkaline phosphatase, and it considers as an aldehyde object. After making it react with RIZAMIN rhodamine ethylenediamine and returning by the Schiff base subsequently, column purification is carried out and labeling RNA of 30-50mer is prepared. Labeling

RNA is made to hybridize to this above-mentioned chip. Labeling RNA(1microg[/micro] L)3microL is added to a hybridization buffer, and is set to 35microL. It heats for 3 minutes at 94 degrees C after filtration purification. 30microL is put on the DNA chip on slide glass after cooling, and a cover glass is calmly put from the direction of an edge. The temperature gradient of a DNA chip is made into 20-80 degrees C, and is made to hybridize for 6 hours. It washes by WOSSHINGUBAFFA after hybridization and analyzes by a detector detecting a fluorescence signal.

[0029] Labeling RNA prepared by the example 2 above is made to hybridize on a DNA chip at 20 degrees C. A temperature up is gradually carried out from 20 degrees C to 95 degrees C in a washing buffer (1xSSC, 1%SDS) after hybridization, and the fluorescence of DNA hybridized for the chip is scanned in the meantime. A curve (drawing 4 6) like [probe / each] drawing 4 is obtained. Since the time (a part for the perpendicular line part of drawing 4) of each curve separating most is considered that singularity is the highest, a quantum is performed about this temperature.

[0030]

[Effect of the Invention] If this invention is used, the trouble of the lowness of the singularity in the conventional DNA chip is canceled, and high hybridization of quantum nature can be performed at once. Moreover, if the fourth invention - the sixth invention are used, high hybridization of quantum nature can be performed quickly, without washing and removing the background.

[0031]

[Layout Table]

SEQUENCE LISTING<110> MITSUBISHI HEAVY INDUSTRIES and LTD<120> Method of determining base sequence by DNA chip<130> 200101079 <160> 7<210> 1 <211> 18<212> DNA<213> Actinomyces<400> 1ggatgagccc gcggccta 18<DNA [210> 2<211> 17<212>] <213> alpha-Pr oteobacteria<400> 2cgttcgytct gagccag 17 <210> 3 <211> 20<212> DNA<213> Planktomyces<400> 3 ccaccgcttg tgtgagcccc 20<DNA[210> 4<211> 18<212>] <213> Cytophaga-Flavobacterium -- < -- 400>4tgggtccgtrt ctctgtac 18 <210> 5 <211> 24<212> DNA<213> Acinetobacter<400> 5 gcttttagtgg cgcagctaac gcga 24 <210> 6 <211> 19<212> DNA<213> Vibrio<4 00>6 tgatgtgggg gataaccat 19 <210> 7 <211> 20<212> DNA<213> Bacteria specific(standard)<400> 7 agagtttgat cctggctcag 20

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-300

(P2003-300A)

(43) 公開日 平成15年1月7日 (2003.1.7)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M	1/00	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
	1/38	1/38	Z 4 B 0 6 3
	1/40	1/40	B
C 1 2 N	15/09	G 0 1 N 33/53	M

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-184949(P2001-184949)

(22) 出願日 平成13年6月19日 (2001.6.19)

(71) 出願人 000006208

三菱重工業株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番1号

(72) 発明者 竹内 和久

長崎県長崎市深堀町五丁目717番1号 三

菱重工業株式会社長崎研究所内

(72) 発明者 杉森 美帆

長崎県長崎市深堀町五丁目717番1号 三

菱重工業株式会社長崎研究所内

(74) 代理人 100112737

弁理士 藤田 考晴 (外3名)

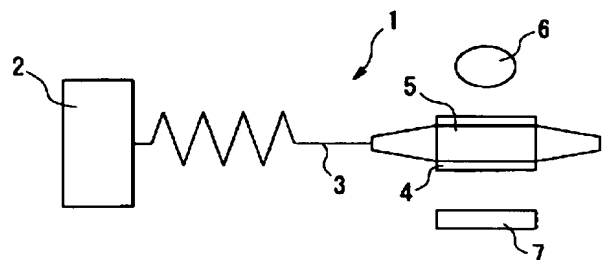
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法

(57) 【要約】

【課題】 DNAチップを用いて、一度に定量性の高いハイブリダイゼーションを行うことができる方法及び該方法を実施するための装置の提供。

【解決手段】 同一の配列を有する複数の塩基配列が1列に固定化されたDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、同一の塩基配列が固定化されている方向に温度勾配を設け、検出すべき塩基配列を標識した後DNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、次いで緩衝液で洗浄した後、1列に固定化された各塩基配列の標識の強度を比較することによって検出すべき塩基配列を決定することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法；並びに緩衝液貯蔵容器と、該緩衝液の加熱手段と、該緩衝液をDNAチップ上を流すための流路と、標識の強度を測定する手段と、を有することを特徴とする塩基配列決定又は核酸定量方法用装置。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 同一の配列を有する複数の塩基配列が1列に固定化されたDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、同一の塩基配列が固定化されている方向に温度勾配を設け、検出すべき塩基配列を標識した後DNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、次いで緩衝液で洗浄した後、1列に固定化された各塩基配列の標識の強度を比較することによって該検出すべき塩基配列の核酸量を定量することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法。

【請求項2】 DNAチップの同一配列の方向を垂直方向に固定し、該DNAチップの上部に加熱部、下部に冷却部のいずれか一方又は両方を設け、垂直方向に温度勾配を設けたことを特徴とする請求項1記載のDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法。

【請求項3】 DNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、検出すべき塩基配列を標識した後DNAチップ上で低温でハイブリダイゼーションさせ、次いで緩衝液を経時的に昇温させながら該緩衝液で洗浄し、昇温過程における各塩基配列の標識の強度をモニタリングすることによって該検出すべき塩基配列の核酸量を定量することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法。

【請求項4】 昇温過程における各塩基配列の標識の強度のバラツキが最も大きくなる温度を検出し、該温度での標識の強度を比較することによって該検出すべき塩基配列の核酸量を定量することを特徴とする請求項3記載のDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法。

【請求項5】 緩衝液貯蔵容器と、該緩衝液の加熱手段と、該緩衝液をDNAチップ上を流すための流路と、標識の強度を測定する手段と、を有することを特徴とする請求項3又は4記載の塩基配列決定又は核酸定量方法用装置。

【請求項6】 緩衝液の加熱手段が、DNAチップ又はDNAチップの周辺を加熱するものであることを特徴とする請求項5記載の塩基配列決定又は核酸定量方法用装置。

【請求項7】 DNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、ハイブリダイゼーション温度を経時的に昇温もしくは経時的に降温させながらDNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、DNAチップに、レーザーシートにした光源をDNAチップの平面方向から照射して、2本鎖となった塩基配列を検出することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法。

【請求項8】 DNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、ハイブリダイゼーション温度を経時的に昇温もしくは降温させながらDNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、2本鎖となった塩基配列

のみを電気化学的手段を用いて検出することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法。

【請求項9】 DNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、ハイブリダイゼーション温度を高温から経時的に降温させながらDNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、2本鎖のみを特異的に検出する試薬をハイブリダイゼーション溶液に加え、2本鎖となった塩基配列を検出することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一度に定量性の高いハイブリダイゼーションを行うことができる方法及び該方法を実施するための装置に関する。

【0002】

【従来の技術】DNAチップは、1～2cm²ほどの固体表面に数百～数十万のDNAプローブをアレイ状に配列したものであり、DNAの検出やスクリーニング等を迅速かつ低コストで行うことができる。これを用いれば、サンプル中に目的の遺伝子が存在するか否かを瞬時に判別することができる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、DNAチップ上の塩基配列は、25塩基程度と比較的短く、1つの基板に多種類のDNAが存在し、それらはそれぞれ異なる塩基配列を有し、また異なる最適ハイブリダイゼーション温度を有するため、特異性に問題が生じる場合が多い。

【0004】したがって、本発明は、DNAチップを用いて、一度に定量性の高いハイブリダイゼーションを行うことができる方法及び該方法を実施するための装置を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究した結果、ハイブリダイゼーションの特異性は温度が重要な因子となることに着目した。そして、同一配列を有する複数の塩基配列をDNAチップ上に一列に配置し、その配列方向に温度勾配を設ける手段、又はDNAチップ上の塩基配列に対して経時的に温度を変化させる手段を用いれば、一度に定量性の高いハイブリダイゼーションを行うことができることを見出し、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明の第一発明は、同一の配列を有する複数の塩基配列が1列に固定化されたDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、同一の塩基配列が固定化されている方向に温度勾配を設け、検出すべき塩基配列を標識した後DNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、次いで緩衝液で洗浄した後、1列に固定化された各塩基配列の標識の強度を

10

20

30

40

50

比較することによって該検出すべき塩基配列の核酸量を定量することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法を提供するものである。

【0007】ハイブリダイゼーションは、特異性（選択性）を重視すれば高温で行うことが好ましいが、強度（ハイブリダイゼーション強度）が低くなるという問題がある。一方、低温で行えば強度は高くなるが、特異性が低くなるという問題がある。したがって、できるだけ低温で、かつ目的の塩基配列とのみハイブリダイズする条件でハイブリダイゼーションを行うことが好ましいが、従来のDNAチップを用いた場合、かかる条件を見出すことが困難であった。上記のように、同一の塩基配列が固定化されている方向に温度勾配を設ける手段をとれば、各塩基配列の強度を容易に検出することができ、目的とする塩基配列の核酸量を特異的に定量することができる。

【0008】本発明の第二発明は、DNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、検出すべき塩基配列を標識した後DNAチップ上で低温でハイブリダイゼーションさせ、次いで緩衝液を経時的に昇温させながら該緩衝液で洗浄し、昇温過程における各塩基配列の標識の強度をモニタリングすることによって該検出すべき塩基配列の核酸量を定量することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法を提供するものである。かかる方法は、DNAチップに固定化された各塩基配列を経時的に昇温させるものである。低温でハイブリダイゼーションさせると、目的とする塩基配列以外の配列ともハイブリダイズし得る。次いで経時的に昇温させた緩衝液で洗浄していけば、ミスマッチが大きいものほどハイブリダイゼーション強度が低下していく。したがって、かかる手段を用いれば、各塩基配列に特徴的な温度特性パターンを得ることができる。また本方法を用いることにより標識の強度のバラツキが最も大きくなる温度を容易に検出することができる。かかる温度が特異性が最も高いと考えられるから、それらの強度を比較することによってその塩基配列の核酸量を容易に定量することができる。

【0009】本発明の第三発明は、緩衝液貯蔵容器と、該緩衝液の加熱手段と、該緩衝液をDNAチップ上を流すための流路と、標識の強度を測定する手段と、を有することを特徴とする上記塩基配列決定又は核酸定量方法に用いるための装置を提供するものである。かかる装置を用いれば、DNAチップに固定化された各塩基配列の昇温、降温を容易に行うことができ、一度に定量性の高いハイブリダイゼーションを行うことができる。

【0010】本発明の第四発明は、DNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、ハイブリダイゼーション温度を経時的に昇温もしくは降温させながらDNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、DNAチップに、レーザーシートにした光源をDNAチップ

の平面方向から照射して、2本鎖となった塩基配列を検出することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法を提供するものである。検出すべき塩基配列は、DNAチップに固定化された塩基配列とハイブリダイズすることによって2本鎖となり、DNAチップに固定される。1本鎖の場合は、ハイブリダイゼーション溶液中を浮遊しており、DNAチップに固定されることはない。したがって、レーザーシートにした光源をDNAチップにDNAチップの平面方向から照射すれば、2本鎖のみを検出することができ、その塩基配列の核酸量を容易に定量することができる。

【0011】本発明の第五発明は、DNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、ハイブリダイゼーション温度を経時的に昇温もしくは降温させながら、DNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、2本鎖となった塩基配列のみを電気化学的手段を用いて検出することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法を提供するものである。電気化学的手段を用いることによって、2本鎖となった塩基配列のみを高精度で検出することができる。

【0012】本発明の第六発明は、DNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法であって、ハイブリダイゼーション温度を高温から経時的に降温させながら、DNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、2本鎖のみを特異的に検出する試薬をハイブリダイゼーション溶液に加え、2本鎖となった塩基配列を検出することを特徴とするDNAチップを用いた塩基配列決定又は核酸定量方法を提供するものである。かかる方法は、2本鎖のみを特異的に検出する試薬を用いるものである。2本鎖のみを特異的に検出する試薬を用いれば、第四発明の場合と異なり、光をDNAチップの上面方向から照射した場合であっても、2本鎖塩基配列を検出することができる。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明の第一発明は、まず同一の配列を有する塩基配列を複数個、DNAチップ上に一列に固定化する。このように一列に固定化された塩基配列を複数種類DNAチップ上に固定化する。次いで、同一の塩基配列が固定化されている方向に温度勾配を設ける。温度勾配は、DNAチップ上の異なる塩基配列の最適ハイブリダイゼーション温度の近似性を考慮して適宜設定することができる。また、異なる塩基配列の最適ハイブリダイゼーション温度が近似している場合は、各塩基配列の温度間隔は小さくすることが好ましい。

【0014】温度勾配の設定は、以下の方法で行うことが好ましい。まず、DNAチップを、同一配列の方向を垂直方向に固定する。同一配列の方向を水平方向に固定すると、温度が拡散する速度が物質が拡散する速度より速いため、ハイブリダイゼーションを十分に行うことができない。そして、上部に加熱部、下部に冷却部のいず

れか一方又は両方を設ける。これにより、垂直方向に温度勾配を形成させることができる。

【0015】次いで、検出すべき塩基配列を標識した後、DNAチップ上でハイブリダイゼーションさせる。標識の方法としては、例えば蛍光試薬を用いる方法、放射性同位元素を用いる方法等が挙げられるが、このうち蛍光試薬を用いる方法が好ましい。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション溶液をDNAチップ上に添加すればよい。反応時間は、ハイブリダイズさせる配列の長さ等に応じて適宜設定することができる。次いで緩衝液を用いて洗浄を行い、バックグラウンドを除去する。

【0016】このようにして得られたDNAチップ上においては、一列に配列された同一の塩基配列のうち、最適ハイブリダイゼーション温度に保持された部分が特異的且つ最大の標識強度を有するため、該塩基配列の核酸量を高い精度で定量することが出来る。

【0017】本発明の第二発明は、まず検出すべき塩基配列を標識した後、DNAチップ上で低温でハイブリダイゼーションさせる。標識の方法は、上記と同様である。ここで、「低温で」とは、検出すべき塩基配列がDNAチップ上のすべての塩基配列とハイブリダイゼーションすることができる程度の温度を意味する。すなわち、第二発明においては、検出すべき塩基配列を、DNAチップ上のすべての塩基配列とハイブリダイゼーションさせる。これは、低温では、相補性の低い塩基配列であってもハイブリダイズすることを利用したものである。

【0018】次いで、緩衝液を経時的に昇温させながら該緩衝液でDNAチップを洗浄する。緩衝液を加熱する方法としては、特に制限はないが、例えば緩衝液貯蔵容器を直接加熱する方法、緩衝液貯蔵容器からDNAチップへのライン中で加熱する方法、あるいはDNAチップやその周辺を直接加熱する方法等が挙げられる。経時的に昇温させるには、加熱手段の強度を経時的に上げればよい。昇温速度は、一定であることが好ましい。緩衝液でDNAチップを洗浄することにより、バックグラウンドを除去する。

【0019】次いで、DNAチップ上の各塩基配列の経時的な標識強度の変化を測定する。ここで、低温では相補性の低い塩基配列でもハイブリダイゼーションするが、昇温するに従ってミスマッチの多い2本鎖から解離していく。そして、ある特定の温度で、DNAチップ上の各塩基配列の標識の強度のバラツキが最も大きくなる。この温度で特異性が最も大きくなると考えられるから、その温度での標識の強度から核酸量を定量する。

【0020】図1は、第二発明を実施するための装置の一例を示したものである。図1において、該装置1は、緩衝液貯蔵容器2、緩衝液のDNAチップ上へのライン3、DNAチップ上の流路5、光源6及び検出部7から

なる。緩衝液は、緩衝液貯蔵容器2及び／又はDNAチップ4へのライン3中で加熱される。緩衝液の温度は、低温から経時的に昇温させていく。低温でのハイブリダイゼーション終了後、経時的に昇温させながら、緩衝液を、DNAチップ上（緩衝液流路5）に送液する。洗浄によるバックグラウンドの除去後、光源6を用いて標識強度を検出部7によって測定する。

【0021】図2は、第二発明を実施するための装置の他の一例を示したものである。緩衝液の加熱部8は、DNAチップの上部にある。緩衝液は、緩衝液流路5を通過する際に加熱部8によって加熱される。緩衝液の温度を低温から経時的に昇温させていくように、加熱部8における加熱強度を調整する。図2においては、標識強度測定装置として、光ファイバを用いて、光源6'、検出器7'が測定対象物に対して同一側にある装置を例示している。ただし、測定装置は、これに限定されるものではない。

【0022】本発明の第四発明は、レーザーシートにした光源を、DNAチップに、DNAチップの平面方向から照射して、2本鎖となった塩基配列を検出、決定するものである。すなわち、DNAチップにDNAチップの平面方向から照射することによって、DNAチップ上でハイブリダイズしたもののみを検出するものである。経時的に昇温もしくは降温させながらハイブリダイゼーションさせつつ、かかる方法での検出を行うことによって、バックグラウンドの洗浄、除去を行うことなく、一度に定量性の高いハイブリダイゼーションを迅速に行うことができる。

【0023】本発明の第五発明は、まず経時的に昇温もしくは降温させながらDNAチップ上でハイブリダイゼーションさせ、次いで、DNAチップ上で2本鎖となった塩基配列のみを電気化学的手段を用いて検出するものである。これにより、バックグラウンドの洗浄、除去を行うことなく、一度に定量性の高いハイブリダイゼーションを迅速に行うことができる。

【0024】電気化学的手段による検出法の一例を以下に示す。最近、2本鎖DNA識別能が極めて高く、安定した電気化学的応答を示す新規リガンドFND (ferrocenyl naphthalenediimide derivative) が開発された。これは、2本鎖DNAへ縫い込み型インターカレートすることにより、DNA二重ラセンの主溝と副溝の両方にリガンド置換基が飛び出す構造を有している。これらの置換基部がかすがいとなってDNA二重ラセンを安定化させると同時に、リガンドをDNA二重ラセンから解離し難くする。しかし、1本鎖DNAに対してはこのような効果はないため、2本鎖DNAに対して極めて高い結合特異性を示す。

【0025】リガンドFNDを用いたDNA検出システムの概念を図3に示す。まず、金電極にチオール化したDNAプローブを結合させ、試料DNA断片とハイブリ

ダイゼーションを行う。そして、リガンドを含む溶液で測定を行い、リガンドの酸化還元応答を電気化学的手法によって測定する。このことにより、目的遺伝子の2本鎖形成量が定量化される。電気化学的手法として、ディファレンシャルパルスボルタモグラフィー(DPV)を用いることにより、460mV付近にリガンドの酸化に伴う電流が流れる。電極上でのリガンドの濃縮による電流値は、2本鎖の形成量に応じて増加する。

【0026】本発明の第六発明は、まずハイブリダイゼーション温度を高温から経時的に降温させながらDNAチップ上でハイブリダイゼーションさせる。次いで、2本鎖のみを特異的に検出する試薬をハイブリダイゼーション溶液に加え、2本鎖となった塩基配列を検出する。2本鎖のみを特異的に検出する試薬としては、例えばSYBR Green I(登録商標:Molecular Probes, Inc)が挙げられる。検出は、例えば254nmのUVを照射することにより行うことができるが、この方法には限定されない。

【0027】次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0028】実施例1

配列番号1~7で表される7種類の塩基配列を、それぞれ複数個ずつDNAチップ上に1列に配列し、その列方向が鉛直方向になるようにDNAチップを固定する。海水1Lを0.2μmヌクレオフィルタでろ過し、フィルター上のバクテリアよりRNAを抽出する。このRNAを塩化マグネシウムで分解し、アルカリフォスファターゼで脱リン酸後、核酸のリボースを酸化してアルデヒド体とする。リザミンローダミンエチレンジアミンと反応させ、次いでシッフ塩基で還元した後、カラム精製し、30~50merのラベル化RNAを調製する。ラベル化RNAをこの上記チップに対してハイブリダイズさせる。ラベル化RNA(1μg/μL)3μLを、ハイブリダイゼーションバッファーに加えて35μLとする。ろ過精製後、94℃で3分間加熱する。冷却後、30μLをスライドガラス上のDNAチップに乗せ、カバーガラスを端の方から静かに乗せる。DNAチップの温度勾配は20~80℃とし、6時間ハイブリダイズさせる。ハイブリダイズ後、ウォッシングバッファーで洗浄し、蛍光シグナルを検出器によって検出し、解析を行う。

【0029】実施例2

上記で調製したラベル化RNAを20℃で、DNAチップ上でハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション後、洗浄バッファー(1×SSC、1%SDS)中で20℃から徐々に95℃まで昇温し、その間、チップにハイブリダイズしているDNAの蛍光をスキャンする。各々のプローブについて図4のような曲線(図4では6本)が得られる。各曲線が最も離れたとき(図4の垂直

線部分)が最も特異性が高いと考えられるので、この温度について定量を行う。

【0030】

【発明の効果】本発明を用いれば、従来のDNAチップにある特異性の低さの問題点が解消され、一度に定量性の高いハイブリダイゼーションを行うことができる。また、第四発明~第六発明を用いれば、バックグラウンドを洗浄、除去することなく迅速に定量性の高いハイブリダイゼーションを行うことができる。

【0031】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>MITSUBISHI HEAVY INDUSTRIES, LTD

<120>Method of determining base sequence by DNA chip

<130>200101079

<160>7

<210>1

<211>18

<212>DNA

<213>Actinomycetes

<400>1

ggatgagccc gcggccta 18

<210>2

<211>17

<212>DNA

<213>α-Proteobacteria

<400>2

cgttcgytct gagccag 17

<210>3

<211>20

<212>DNA

<213>Planktomycte

<400>3

ccaccgcttg tgtgagcccc 20

<210>4

<211>18

<212>DNA

<213>Cytophaga-Flavobacterium

<400>4

tggtcgtrt ctgagtac 18

<210>5

<211>24

<212>DNA

<213>Acinetobacter

<400>5

gctttagtgg cgcagctaac gcga 24

<210>6

<211>19

<212>DNA

<213>Vibrio

<400>6

tgatgtgggg gataacat 19

<210>7

<211>20

<212>DNA

<213>Bacteria specific(standard)

<400>7

agagtttgat cctggctcag 20

【図面の簡単な説明】

【図1】 第二発明を実施するための装置の一例を示したものである。

【図2】 第二発明を実施するための装置の一例を示したものである。

【図3】 リガンドFNDを用いたDNA検出システムの概念を示すものである。

【図4】 実施例2における、時間に対する蛍光強度の関係を示す図である。垂直線は、各曲線が最も離れる点(温度)を示している。図4においては、曲線は6本で*

* あるが、曲線の数 はDNAチップ上の塩基配列の数に等しい。

【符号の説明】

1: 本発明の塩基配列決定又は核酸定量方法に用いる装置

2: 緩衝液貯蔵容器

3: 緩衝液のDNAチップ上へのライン

4: DNAチップ

5: DNAチップ上の流路

6、6': 光源

7、7': 検出部

8: 加熱部

9: DNAセンサー

10: 対極

11: 温度センサー

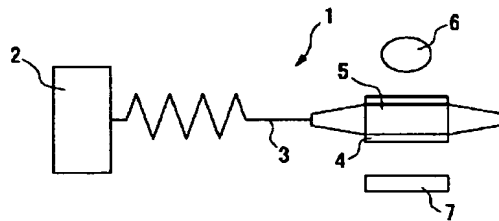
12: DNAプローブ修飾電極

13: 参照電極 (Ag/AgCl₂)

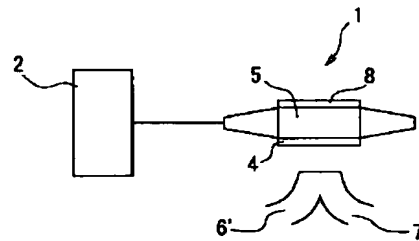
14: 電界溶液

15: 恒温槽

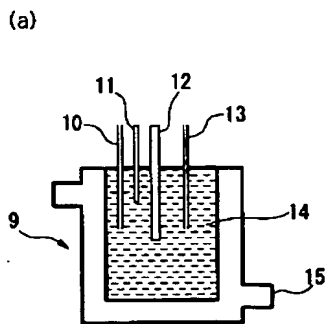
【図1】



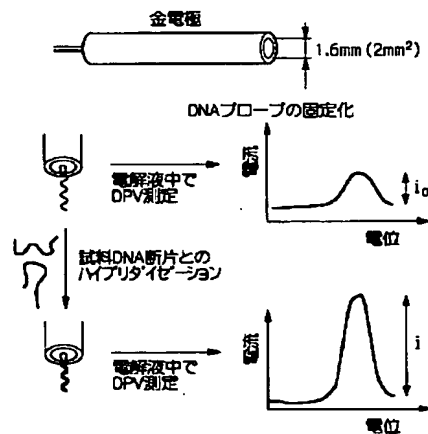
【図2】



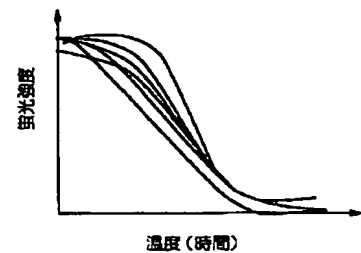
【図3】



(b)



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

G 0 1 N 33/53

33/566

識別記号

Z N A

F I

G 0 1 N 33/566

C 1 2 N 15/00

テーマコード(参考)

Z N A A

A

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA09

CA11 HA12

4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 CC08

FA12 FA15

4B063 QA01 QA13 QQ41 QR32 QR51

QR56 QR84 QS34 QS36 QS39

QX04